

Министерство образования и науки РФ

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет  
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

УДК 581.1

УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по науке  
\_\_\_\_\_ Кружаев В.В.  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013

## ОТЧЕТ

### О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках выполнения п.1.2.2.3 Плана реализации мероприятий Программы развития  
УрФУ на 2013 год

ПО ТЕМЕ:

**«Клеточная селекция растений клевера и табака на устойчивость к высоким  
дозам меди»**

(Заключительный)

Зав.кафедрой и научный  
руководитель

\_\_\_\_\_  
(подпись, дата)

к.б.н., доц. И.С. Киселева

Исполнитель

\_\_\_\_\_  
(подпись, дата)

А.А. Ермошин

Екатеринбург 2013

## Реферат

1. ФИО автора (ов): Ермошин Александр Анатольевич

Ermoshin Alexander

2. Аннотация: Проведен подбор питательных сред для культивирования каллусов клевера ползучего. Подобраны селективные концентрации ионов меди для растений клевера и табака, с целью последующей клеточной селекции на устойчивость к высоким дозам тяжелых металлов. Показано, что в культуре *in vitro* каллусы растений обладают большей устойчивостью к действию тяжелых металлов, чем проростки растений *in vivo*. Получены клеточные линии, устойчивые к содержанию меди в среде более 200 мкМ. Данные культуры потеряли морфогенные свойства. Ведется анализ механизмов устойчивости и причин потери морфогенности данных культур.

The culture media for white clover callus were selected. Copper ions selective concentration for tobacco and white clover plants was chosen for further cell selection for resistance to high level of heavy metals. It was shown *in vitro* that plant calli had greater resistance to heavy metals than the plant seedlings *in vivo*. Cell lines resistant to copper in concentration more than 200 mkM were obtained but the cultures lost its morphogenic properties. The resistance mechanisms and the reasons of morphogeneity loss are being conducted.

3. Ключевые слова: клеточная селекция, растения-гипераккумуляторы, клевер ползучий, табак, ионы меди, устойчивость, тяжелые металлы.

Cell selection, hyperaccumulation plants, white clover, tobacco, copper ions, heavy metals, resistance.

4. Тема отчета: «Клеточная селекция растений клевера и табака на устойчивость к высоким дозам меди.

Cell selection of tobacco and clover plants for resistance to high level of copper ions.

## Содержание

Введение	3
Характеристика объектов исследования	4
Методы исследования	4
Результаты и обсуждения	6
Введения в культуру клевера ползучего и условия и получения каллуса	6
Определение чувствительности клевера ползучего к ионам меди на ранних этапах онтогенеза	12
Определение чувствительности табака к ионам меди на ранних этапах онтогенеза	15
Влияние ионов меди на ткани табака	17
Заключение	19
Литература	20

## Введение

Активная деятельность человека приводит к загрязнению окружающей среды различными видами поллютантов. Особенно остро стоит проблема загрязнения наземной и водной среды тяжелыми металлами (ТМ). Почвы, загрязненные металлами становятся не пригодными для использования в сельском хозяйстве.

Попадая в растения ТМ вовлекаются в пищевые цепи и накапливаются в тканях консументов в опасных дозах. Поэтому актуальным становится изучение механизмов устойчивости растений КТ и выведение новых сортов и линий, толерантных к высоким дозам металлов.

Классическая селекция требует длительного времени, больших территорий, которые необходимо искусственно заражать металлами. Современные методы биотехнологии позволяют за меньшее время, в независимости от сезона, на не больших производственных площадках получить новые клеточные линии растений, устойчивых к ТМ, вскрыть физиологические механизмы их устойчивости и регенерировать из них новые устойчивые линии, которые могут быть интересны для сельского хозяйства.

Исходя из выше сказанного, целью нашей работы было получение исходного материала для клеточной селекции клевера ползучего и табака на устойчивость к действию ТМ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать оптимальный состав фитогормонов, питательную среду и условия культивирования каллюсов клевера ползучего.
2. Выявить токсичные и летальные дозы ионов меди для растений клевера и табака.
3. Изучить реакции растений табака на действие ионов меди.

## Характеристика объектов исследования

Клевер ползучий (*Trifolium repens* L.) – многолетнее травянистое растение из семейства бобовых с длинным ползучим укореняющимся стеблем. Растение с широким ареалом, распространенное на всех континентах, в зонах с умеренным и тропическим климатом. Представляет интерес для сельского хозяйства, так как является отличным кормовым растением, превосходным медоносом, используется как сидератное удобрение на полях, быстро отрастает после укосов и устойчив к вытаптыванию. Из нетрадиционных применений клевера в сельском хозяйстве можно отметить его применение в качестве газонной травы, для создания на газоне эффекта альпийского луга. Так же в некоторых странах Азии и Кавказа используются молодые побеги как компонент зеленых салатов. В доступной нам литературе мы не обнаружили данных о культивировании клевера ползучего *in vitro*. Важные для сельского хозяйства особенности клевера и отсутствие сведений о введении его в культуру и обусловило наш интерес к этому растению, как кандидата для клеточной селекции на устойчивость к ТМ.

Табак (*Nicotiana tabacum* L.) – однолетнее растение из семейства пасленовых. Растение теплолюбиво, поэтому не культивируется на большей территории нашей страны. Однако табак является удобной и широко распространенной моделью в физиологических исследованиях. Подробно охарактеризована морфология и анатомия табака, изучена его физиология и биохимия, аннотирована значительная часть генома. табак легко культивируется *in vitro*, изучены изменения происходящие в клетках табака при их длительном культивировании. Табак интересен не только как модельный объект, но и как техническая культура. В тканях табака содержится большое количество никотиновой и лимонной кислоты, используемых в медицине, алкалоида никотина, который используется как инсектицид и как предшественник в синтезе никотиновой кислоты. табак накапливает большую биомассу, поэтому может быть интересен для целей фиторемедиации.

## Методы исследования

Токсичность металлов определяли на проростках растений клевера ползучего и табака. Для этого в чашку Петри диаметром 10 см на 2 слоя фильтровальной бумаги наливали 10 мл раствора с исследуемой концентрацией металла помещали от 50 до 100 семян тестовой культуры. На 2 и 5 дней определяли всхожесть растений, на 5 день

измеряли длину корешка и гипокотеля проростка, содержание фотосинтетических пигментов.

Для определения пигментов из 20 проростков экстрагировали пигменты в 2 мл 96% этанола, определяли поглощение экстрактов при 440,5, 649 и 665 нм. Концентрацию пигментов вычисляли по формулам и выражали в мкг на растение.

Выявляли концентрацию, которая давала достоверные отличия в ростовых показателях и концентрации пигментов (минимальная токсичная концентрация), концентрацию, на которой все проростки погибали (летальная концентрация) и концентрацию, которая вызывала приблизительно 50% угнетение ростовых процессов, в сравнении с контролем. Данную концентрацию и предполагаем использовать для клеточной селекции.

Содержание белка в листьях растений определяли по методу Бретфорд, уровень перекисного окисления липидов – по образованию окрашенного продукта реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой, активность каталазы – по ингибированию фотоокисления нитросинеготетразолия, активность пероксидазы – по окислению гваякола перекисью водорода.

Каллюсные культуры получали из асептических проростков. Семена стерилизовали 20 минут в смеси 70% этанол а и 3% перекиси водорода, после чего высушивали в токе стерильного воздуха и высевали на агаризованую среду Мурасиге и Скуга (МС) без добавления сахарозы и витаминов, с добавлением антибиотика цефотаксима (200 мг/л), антимикотика амфотерицина Б (2,5 мг/л). Семядольные листья и гипокотели 7-10 дневных проростков использовали для получения каллуса. Каллус индуцировали на среде МС с 3% сахарозы или среде Гамбург В-5 с 2% сахарозы и различными концентрациями антибиотиков 2,4-Д, бензиламинопурина, кинетина, нафтилуксусной кислоты (гормоны фирмы Sigma) в темноте или при фотопериоде 16/8.

Исследование всхожести и измерение морфологических показателей проростков и их размеров проводили в 3х независимых экспериментах. Пигменты определяли в 3х биологических повторностях из усредненных выборок, показатели роста определяли в 60 – 80 биологических повторностях.

Культивирование каллюсов проводили в 2х независимых экспериментах по 3 повторности в каждом.

Определение физиологических реакций на стресс изолированных фрагментов листьев табака проводили в 2х независимых экспериментах, по 3 – 5 биологических и 2 аналитических повторности в каждом.

Достоверность отличий во всхожести семян, выживаемости и интенсивности регенерации каллюсов определяли по угловому преобразованию Фишера. Достоверность отличий в ростовых показателях определяли с помощью критерия Стьюдента, после проверки выборки на нормальность распределения. Отличия в физиологических показателях стресса и содержании пигментов определяли по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Анализ данных проводился в пакетах Statistika 5.0, MS Excel 2003.

## **Результаты и обсуждения**

### **Введения в культуру клевера ползучего и условия и получения каллуса**

Известно, что тип экспланта оказывает значительное влияние на способность образовывать каллюс. Чаще всего, чем более молодой эксплант используется для получения культуры клеток, тем с большей интенсивностью он образует каллюс. При этом разные части растений обладают неодинаковой способностью к каллюсогенезу. Для растений клевера ползучего и люпина было показано, что наибольшей способностью к каллюсообразованию отличаются семядольные листья.

В наших исследованиях мы использовали в качестве первичного экспланта семядольные листья и гипокотели, а так же черешки и сегменты листьев пробирочных растений, т.к. этот материал всегда есть в наличии и не требует стерилизации в отличие от тканей проростков.

Для культивирования бобовых рекомендуется использовать среду Гамборга (Б5), однако среда МС считается одной из самых универсальных и богатых. Для культивирования каллюсов мы испытали оба состава сред.

Чаще всего каллусы культивируют в темноте, т.к. каллусная культура питается гетеротрофно и культивирование без света является более дешевым. Однако ряд

каллюсных культур лучше растут на свету. Для получения каллусов клевера ползучего мы испытали так же оба варианта.

Индукция каллусной культуры происходит под действием фитогормонов. Ауксины вызывают дедефференцировку тканей и возврат клеток к ювенильному состоянию, а цитокинины вызывают интенсивные клеточные деления. В биотехнологических целях используют различные синтетические фитогормоны, отличающиеся разной физиологической активностью. Для индукции каллусов необходимо создать повышенную. Концентрацию ауксинов, относительно уровня цитокининов.

В нашей работе мы использовали несколько сочетаний фитогормонов, что бы отобрать ту комбинацию, которая дает наилучшие результаты.

Мы не нашли в литературе, какое сочетание гормонов необходимо для индукции каллюса клевера ползучего. Однако в литературе имеются данные об условиях культивирования другого вида клевера – клевера лугового. Исходя из того, что это представители одного рода, относящиеся к одной экологической группе и имеющие пересекающиеся ареалы, мы предположили, что условия культивирования клевера ползучего должны быть близки к условиям культивирования клевера лугового.

Из имеющихся в литературе прописей мы отобрали два состава, при которых каллусы клевера лугового наиболее хорошо росли и не теряли способность к морфогенезу. При этом мы так же выбирали те составы, которые позволяли уменьшить стоимость питательных сред.

Нами было выбрано и отобрано две комбинации фитогормонов, которые давали хорошие результаты для клевера лугового (табл. 1).

Таблица 1. Комбинации фитогормонов, использованные в работе

Шифр	Состав фитогормонов, мг/л	% каллусогенеза для клевера лугового
К3	2,4-Д – 2 НУК – 0,5 Кин – 2	95,6 – 99,2
К8	НУК – 1 БАП – 1	70,9 – 83,4



Прим.: 2,4-Д – 2,4-дихлорфенкусовая кислота (ауксин), НУК – нафтилуксовая кислота (ауксин), ИУК – индолилуксусная кислота (природный ауксин), БАП – бензиламинопурин (цитокинин), Кин – кинетин, фурфуриламинопурин (цитокинин).

Таким образом нами было опробовано 8 вариантов выращивания каллусов клевера ползучего (табл. 2).

Таблица 2. Условия культивирования каллюса клевера ползучего

Среда \ освещенность	Темнота	Фотопериод 16/8
К3	МС Гамбург Б5	МС Гамбург Б5
К8	МС Гамбург Б5	МС Гамбург Б5

Лучшие результаты, как и с клевером луговым показала среда К3. На среде К8 наблюдался медленный рост каллюса, меньший процент его образования, больше эксплантов гибли, часто происходило побегообразование. Большая эффективность среды К3, в сравнении с К8 может объясняться более высоким тотальным содержанием фитогормонов, из-за чего каллюс рос быстрее, содержанием цитокинина с более низкой физиологической активностью и сильного дедифференцирующего фактора, что препятствовало побегообразованию и способствовало интенсивной индукции каллюса. На среде К8 выживало только 28 – 63% первичных эксплантов, а на среде К3 от 33 до 71%, в зависимости от типа экспланта и освещенности. Достоверных отличий в выживаемости каллюсов на разных гормональных фонах нами не отмечено, однако среды существенно отличались по частоте образования каллюса.

Среда МС в нашем случае больше подходила для роста каллюсов, чем среда Гамборга В-5. Экспланты на ней выживали и активно образовывали каллюс, в то время как на среде Гамборга большая часть эксплантов гибли.

Большей выживаемостью отличались экспланты гипокотелей. Чем семядолей, что не совпадает с результатами полученными на клевере луговом. Выживало на 10 – 30% больше эксплантов гипокотелей, чем семядолей, отличия были статистически значимы.

Культивирование на свету существенно не влияло на выживаемость первичных эксплантов гипокотелей, поэтому для наших дальнейших экспериментов мы использовали

среду МС с составом фитогормонов КЗ и выращивание на фотопериоде 16/8. Результаты данного этапа работы представлены на рис. 1 - 3.



Рис. 1. Образование первичных каллюсов клевера ползучего на среде МС с сочетанием гормонов КЗ, культивирование на свету. Видны некрозы и слабый каллюсогенез на семядольных эксплантах и пролиферация плотного зеленого морфогенного каллюса на эксплантах гипокотелей.



Рис. 2. Регенерация побегов клевера ползучего на среде МС с гормонами К8. Видно, что значительная часть эксплантов на данной среде не выживает.

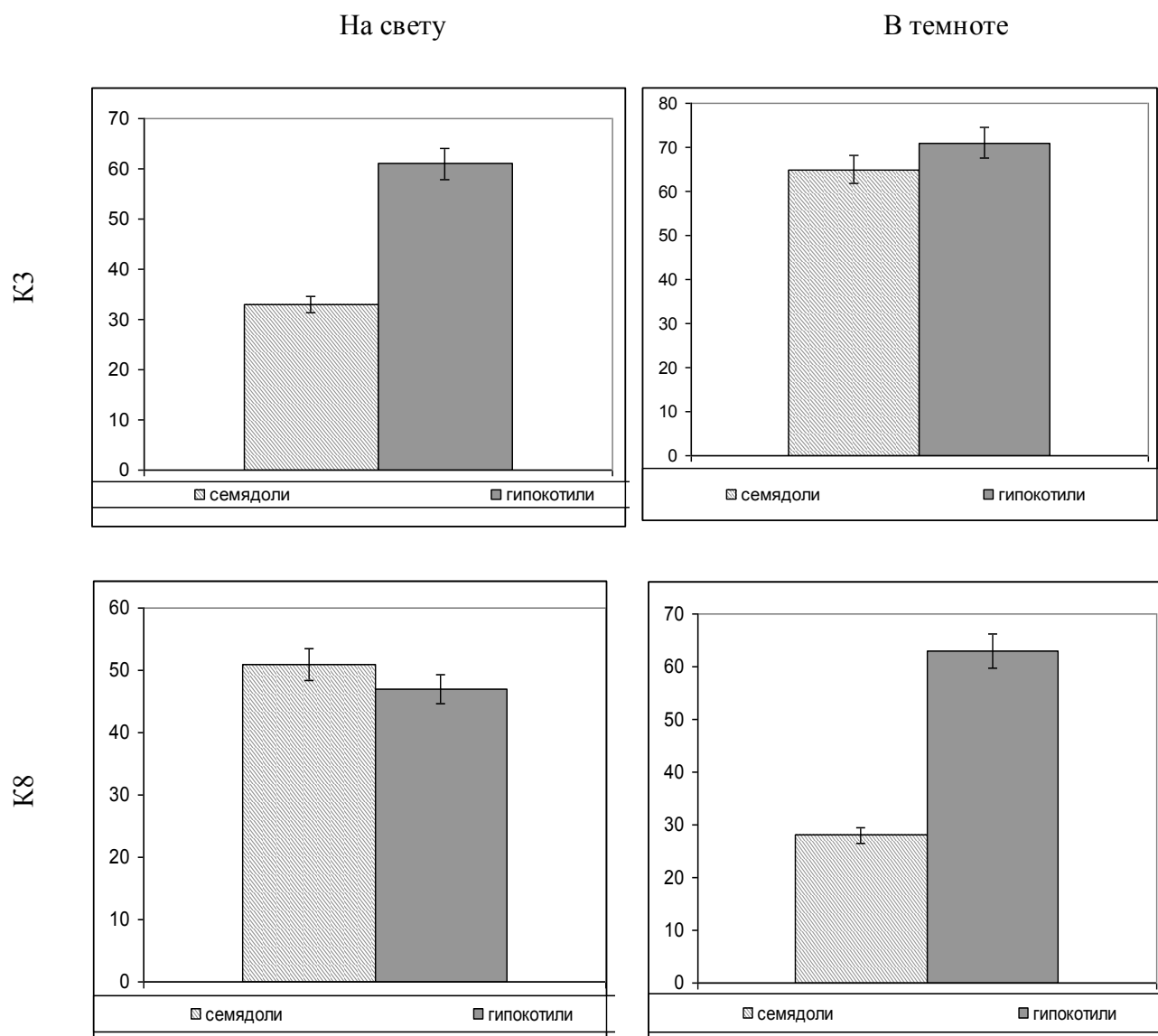


Рис. 3. Доля выживших (%) первичных эксплантов клевера ползучего, при разных условиях культивирования на среде МС.

В связи с тем, что получение эксплантов семядолей и гипокотелей сопряжено с необходимостью стерилизации семян перед каждым экспериментом, а исходный материал для селекции отличается большой генетической вариабельностью, мы рассмотрели возможность использовать в качестве исходного материала для получения каллюсов черешки листьев и фрагменты листа асептических растений клевера, культивируемых *in vitro*. Для культивирования мы использовали те условия, которые были подобраны для

гипокотильных и семядольных эксплантов – среда МС, смесь гормонов КЗ, фотопериод 18/6.

Не смотря на то, что чаще всего к образованию каллюсов склонны молодые органы растений и в процессе развития способность к каллюсогенезу падает, ткани черешков и листовых пластинок настоящих листьев давали каллюс с большей частотой и скорость роста каллюса была больше. Каллюсы. Полученные из ювенильных органов пересаживали каждые 4-5 недель, в то время как каллюсы из настоящих листьев требовали пересадки уже через 3 недели.

Если сравнивать выживаемость и способность к каллюсогенезу у черешков и у листовых пластинок, то черешки листа показали лучший результат, в сравнении с листовой пластинкой (табл. 3), это может объясняться наличием камбиальных клеток в составе проводящих пусков черешка листа. Так же для каллюсов, полученных из зрелых тканей листа было характерно разделение на две, визуальнo отличимые группы – зеленый каллюс, в котором были заметны мерестематические очаги, наблюдалось спонтанное образование корней, которые давали начало вторичным каллюсам и желтый каллюс, который не показывал наличия мерестематических очагов, но не обладал повышенной скоростью роста, т.е. его нельзя отнести к неморфогенному каллюсу (табл. 3, рис. 4).

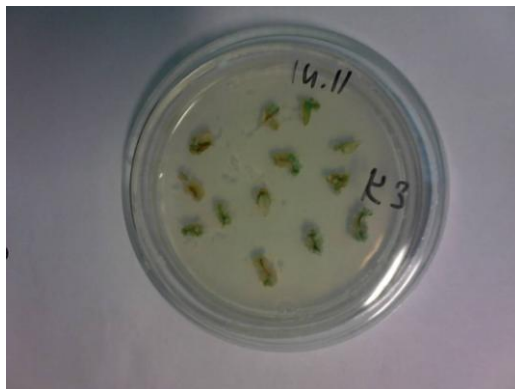


Рис. 4. Каллюсы из черешков листьев клевера ползучего. Видны две популяции – окрашенные в зеленый и в желтый цвет.

Таблица 3. Частота образования каллюса из тканей настоящих листьев

Тип экспланта	% каллюсообразования	% зеленых каллюсов	% желтых каллюсов
черешки	97	81	19
Листовые пластинки	67	33	77

Таким образом, в результате данного этапа работы были подобраны условия для индукции и культивирования каллюсов клевера ползучего. Наилучшим эксплантом для каллюсогенеза оказались черешки настоящих листьев. Оптимальная среда для культивирования – средам МС (Мурашиге и Скуга) с добавлением 2 мг/л 2,4-Д, 0,6 мг/л НУК и 2 мг/л кинетина. Каллусы культивируют на фотопериоде 16/8, перенося на свежую среду каждые 3 недели.

Нами был получен активно растущий каллус, давший две субпопуляции, отличающиеся внешне по окраски. Данные клеточные линии будут использованы для селекции на устойчивость к тяжелым металлам.

### **Определение чувствительности клевера ползучего к ионам меди на ранних этапах онтогенеза**

Прежде чем приступить к селекции каллюсов на устойчивость к тяжелым металлам, необходимо определить чувствительность к данным металлам растений дикого типа. Наиболее подходящей моделью могут являться проростки растений, т.к. стадия прорастания семян является наиболее уязвимой и чувствительной к действию неблагоприятных факторов среды. Ткани проростков одержат активно делящиеся клетки, значительным образом питающихся гетеротрофно, за счет запаса питательных веществ семени, что делает эту модель наиболее близкой к клеткам, находящимся в культуре *in vitro*.

В качестве токсикантов в эксперименте использовали растворы сульфата меди в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ, 1 мМ, 5 мМ по металлу. Концентрация 10 мкМ не оказывала заметного влияния на исследуемые ростовые показатели, а 5 мМ была летальной для проростков, поэтому все результаты представлены только для концентрации 50 мкМ – 1 мМ.

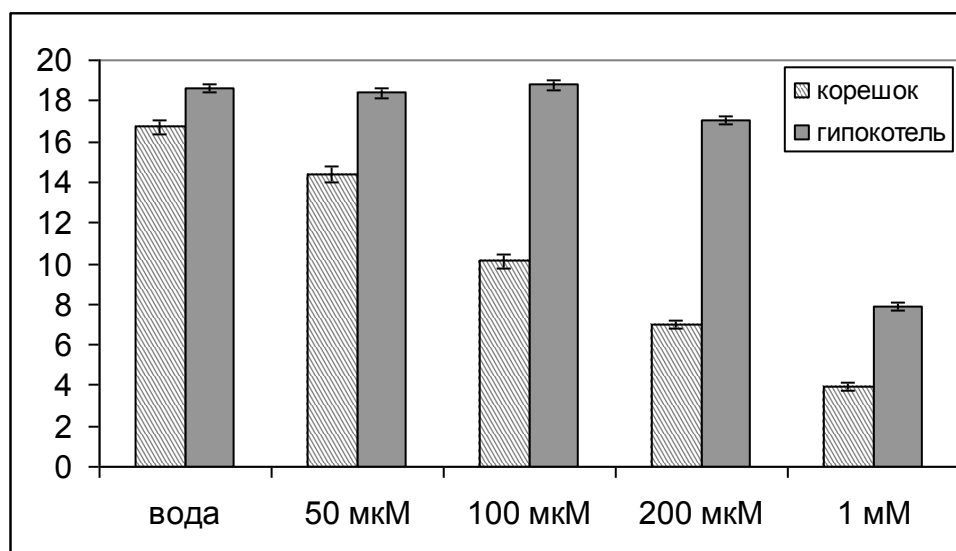


Рис. 5. Влияние ионов меди на длину (мм) корешка и гипокотеля клевера ползучего

Как видно из рис. 5. Показатель длины корешка более чувствителен, чем длина побега. Уже 50 мкМ металла вызывают достоверное уменьшение длины корешка, с ростом концентрации происходит практически линейное уменьшение длины корешка. Ионы меди в концентрации 200 мкМ вызывают 50% ингибирование роста корешка, а при содержании меди в среде 1мМ корешок достигает только четверти своей длины. Изменение длины гипокотеля значительно менее чувствительно к действию тяжелых металлов – только при содержании меди в среде 200 мкМ происходит незначительное уменьшение длины гипокотеля, а наибольшая исследованная концентрация ингибирует рост корня всего на 50%.

Кроме показателей линейных размеров гипокотеля и корешка мы изучили влияние ионов меди на всхожесть семян, как интегральный показатель жизнеспособности растений (Рис. 6). По влиянию на всхожесть семян ионы меди оказались более токсичны, чем ионы алюминия. Низкая доза ионов меди (50 мкМ) не оказала влияние на всхожесть семян, хотя уже оказывала токсичное действие на развитие корня. А уже 100 мкМ ионов меди вызывали 50% ингибирование всхожести семян. Существенных отличий во влиянии 100 и 200 мкМ ионов меди на всхожесть семян клевера ползучего не показано – повышение дозы токсиканта в 2 раза вызывает уменьшение всхожести на одну треть. Максимальная исследованная концентрация меди понижает всхожесть семян до 12%.

Так же известно, что под действие металлов происходит угнетение интенсивности фотосинтеза. В значительной степени это связано с деградацией фотосинтетических пигментов. Поэтому изменение содержание суммы хлорофиллов мы будем использовать как еще один маркер стресса. Достоверное снижение содержания суммы хлорофиллов вызывает обработка проростков уже 100 мкМ меди, 200 мкМ вызывают уменьшение их содержания в два раза, а 1 мМ в три раза от контроля.

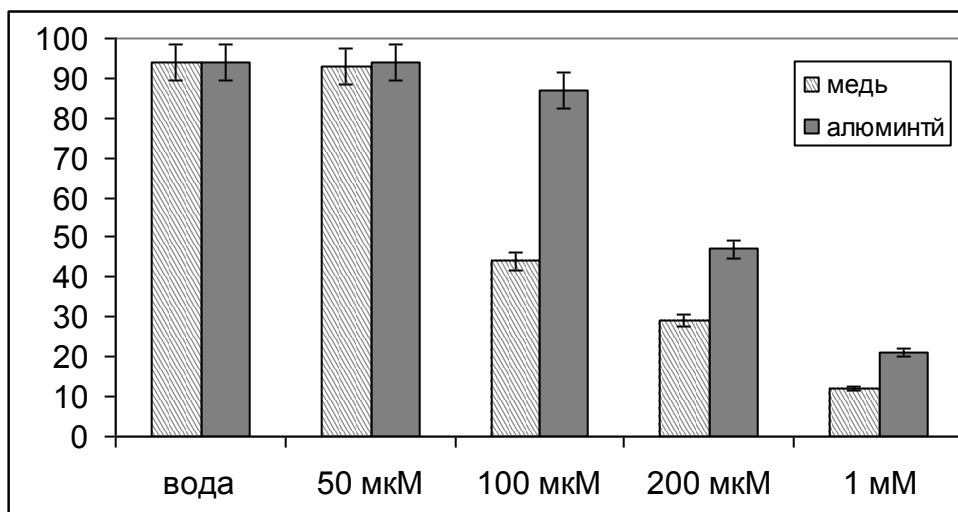


Рис. 6. Всхожесть семян (%) клевера лугового при действии ионов меди и алюминия

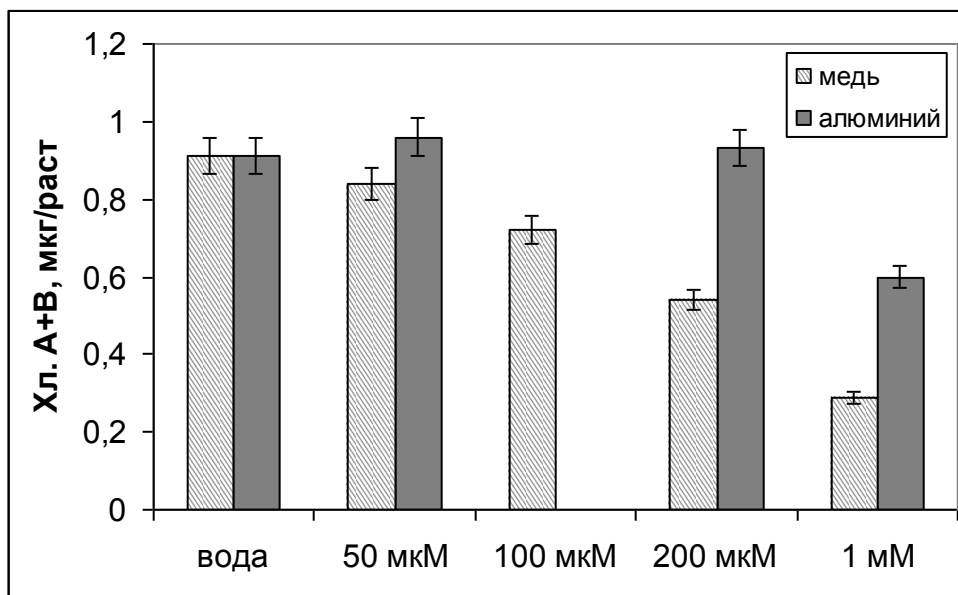


Рис. 7. Содержание суммы хлорофиллов в проростках клевера ползучего под действием ионов алюминия и меди.

В результате данного этапа работы были подобраны концентрации металлов, которые могут быть использованы для селекции. Они являются сублетальными, т.е. оказывают заметное токсическое действие на растение, но не вызывают его гибель. В качестве селективной концентрации ионов мы предлагаем использовать ту, которая вызывает 50% уменьшение большинства исследованных показателей. Для ионов меди мы предлагаем использовать для селекции концентрацию в 200 мкМ. При этой концентрации в два раза уменьшается длина корешка и содержание фотосинтетических пигментов, уже становится заметно негативное действие стрессора на рост гипокотеля, более чем в два раза происходит снижение всхожести.

### **Определение чувствительности табака к ионам меди на ранних этапах онтогенеза**

Табак – распространенная модель для биотехнологических манипуляций. Технология получения и культивирования каллуса табака разработана во всех деталях, поэтому для данной культуры мы не подбирали условия для культивирования.

Мы сразу поставили задачу определения чувствительности табака к ионам меди. Задача была решена на модели проростков и на модели высечек из листьев растений *in vivo*.

Для определения чувствительности проростков табака к ионам меди были выбраны следующие модели: 0 (вода, контроль), 125 мкМ, 500 мкМ и 2 мМ. Концентрация в 2 мМ оказалась летальной для проростков табака – семена прорастали, после чего рост останавливался и растения гибли. В результате этого, для этой концентрации мы имеем только данные по всхожести (рис. 8).

Проростки растений табака интересно реагируют на обработку ионами меди. Все исследованные концентрации, включая летальную не вызывают значительное снижение всхожести семян. При этом достоверно значимое снижение всхожести, на 22% от контроля, наблюдается только при летальной концентрации меди.



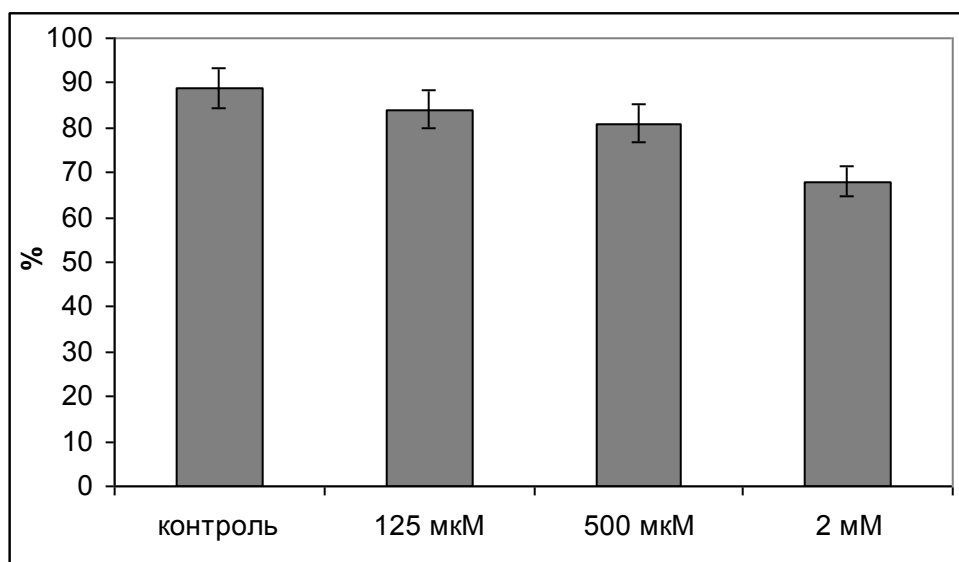


Рис. 8. Всхожесть семян табака при действии ионов меди

Ионы меди вызывают интенсивную деградацию фотосинтетических пигментов у проростков табака. Уже 125 мкМ вызывают достоверное содержание их в растении, а 500 мкМ вызывают почти 4-х кратное снижение их количества, от уровня в контроле.

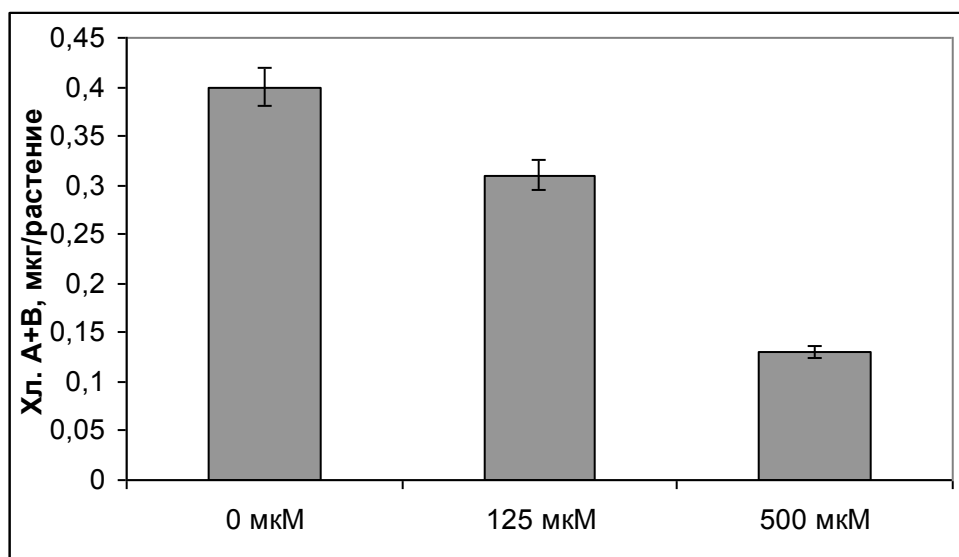


Рис. 9. Содержание суммы хлорофиллов в тканях растения табака при обработки их ионами меди

Что касается морфологических характеристик проростков табака, то как и в случае с проростками растений клевера, уменьшение длины корешка – это более чувствительный

показатель, чем изменение длины гипокотеля. Более того – растения табака оказались значительно чувствительнее к действию ионов меди, чем проростки клевера ползучего. Уже 135 мкМ вызвали уменьшение длины корешка табака в 6,7 раза, тогда как у клевера такая концентрация ионов меди вызывала менее, чем двух кратное уменьшение длины корешка проростка (рис. 10).

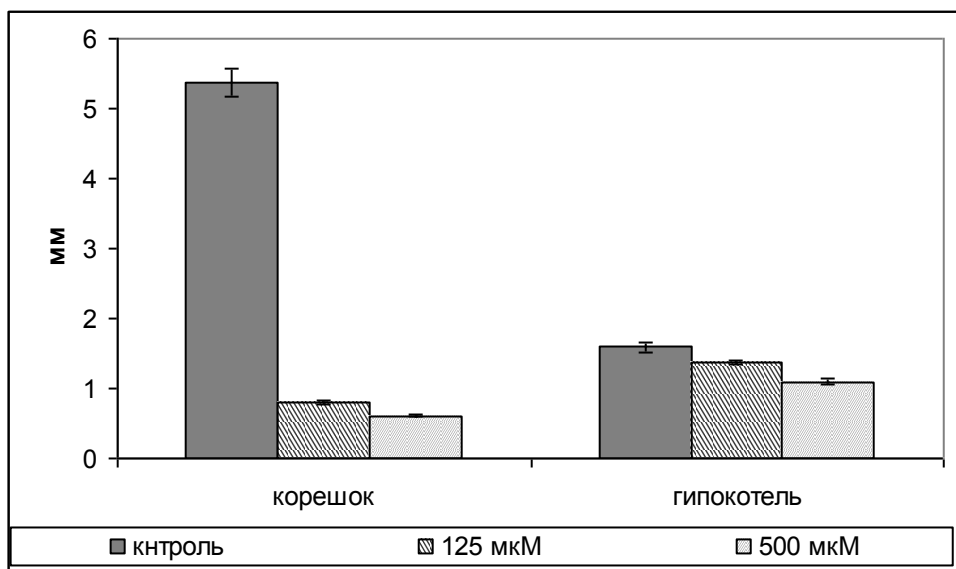


Рис. 10. влияние ионов меди на рост корешка и гипокотеля проростков табака

Исходя из полученных нами данных, для клеточной селекции растений табака мы можем порекомендовать концентрацию ионов меди больше 125 мкМ, но не более 500. Эти концентрации не влияют существенно на всхожесть семян и длину гипокотеля, снижают содержание пигментов на треть, однако вызывает значительное, до 7 раз уменьшение длины корешка.

### Влияние ионов меди на ткани табака

Изменения происходящие в тканях проростков не всегда адекватно отражают то, что будет происходить при стрессе в тканях взрослого растения. Поэтому мы изучили так же эффекты краткосрочного воздействия высоких доз меди на фототрофные ткани табака. В качестве маркеров стресса мы определяли уровень перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) и деградацию растворимого белка. Опыт проводили на высечках из листьев среднего яруса 2х месячных растений табака, выращенных в условиях закрытого

грунта. В качестве стрессирующего агента использовали ионы меди в концентрации 200 мкМ, 1 мМ и 10 мМ, длительность воздействия составляла 3, 6 и 12 ч.

Если рассматривать содержание растворимого белка как интегральный показатель состояния растения, то через 3 часа действия стресса только наибольшая концентрация сульфата меди (10 мМ) вызвала достоверное снижение содержания белка с 5.2 до 3.2 мг/г сырого веса. При 6 часовом действии меди так же достоверное снижение наблюдали только на наибольшей концентрации. При этом концентрация белка снизилась до 1.9 мг/г. Через 12 часов на всех исследованных концентрациях содержание белка достоверно снизилось – до 3.9 мг/г при 0.2 и 1 мМ и 0.9 мг/г при 10 мМ (рис. 11).

Переокисление липидов мембран – наиболее часто определяемый маркер стресса. Активные формы кислорода вызывают окисление ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов. При этом происходит цепная реакция, сначала образуются гидроперекиси липидов, далее диеновые и триеновые конъюгаты. Конечный продукт деградации мембран – малоновый альдегид, который мы определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Данный маркер стресса оказался наиболее ранним. Уже через 3 часа содержание ТБК-реагирующих продуктов возросло во всех вариантах опыта с 15.2 в контроле до 28.8, 33.6, 49.8 мкМ/г сырого веса при 0.2, 1 и 10 мМ ионов меди соответственно. Через 6 ч. не произошло существенного изменения в содержание продуктов ПОЛ между различными концентрациями меди. Через 12 часов содержание ТБК-реагирующих продуктов при 0.2 и 1 мМ возросло незначительно, тогда как при 10 мМ возросло до 89.1 мкМ/г (рис. 12).

Как видно, все использованные концентрации меди вызывают окислительный стресс у растений табака. При этом при 0.2 мМ меди уровень стресса через 3 часа наименьший и достоверно отличается от уровня стресса, развившегося через 6 ч. Существенных различий в уровне ПОЛ через 6 и 12 часов воздействия поллютантом не обнаружено. Воздействие 1 мМ меди вызывало примерно одинаковый стресс во все временные интервалы, а 10 мМ оказывало одинаковый стресс через 3 и 6 ч. При этом окислительный стресс значительно возрастал через 12 часов.

Наиболее удобными ранними маркерами окислительного стресса для табака являются уровень ТБК-реагирующих продуктов и содержание растворимого белка. Содержание хлорофиллов можно использовать в качестве стрессового маркера при более длительных экспозициях и / или концентрациях металла.

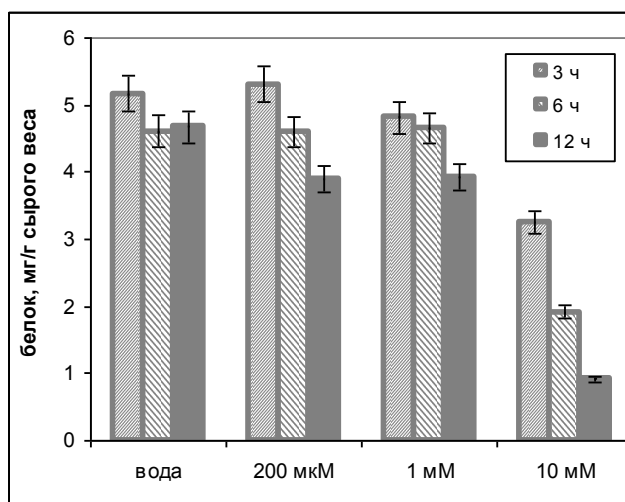


Рис. 11. Содержание растворимого белка в листьях табака при стрессе

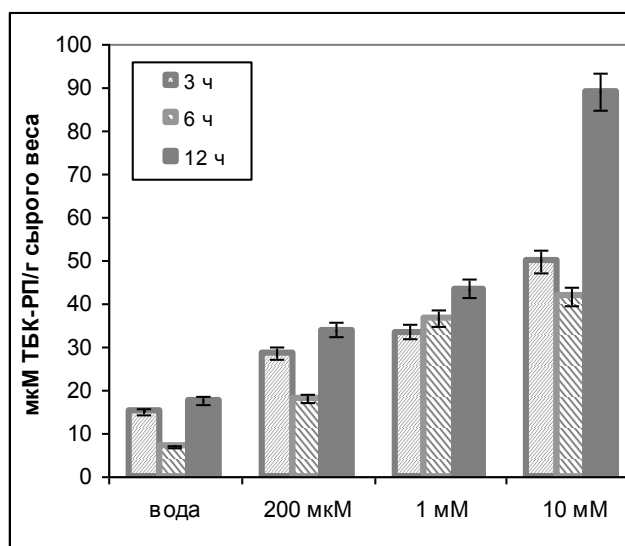


Рис. 12. Уровень ПОЛ в листьях табака при стрессе

## Закключение

В результате проделанной нами работы были подобраны условия культивирования, состав фитогормонов и исходный материал для получения каллюсов клевера ползучего. Для получения каллюсов наиболее оптимальными условиями является культивирование эксплантов на свету, фотопериод 16)8 ч. день/ночь, среда МС с добавлением 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л НУК, 2 мг/л кинетина.

Наиболее эффективно идет образование каллюсов из черешков настоящих листьев, растений выращенных в асептических условиях. При этом популяция клеток разделяется на две, отличающихся внешне по цвету.

Определен интервал чувствительности проростков клевера ползучего к действию ионов меди. Концентрация 10 мкМ не оказывала существенного влияния на ростовые и физиологические особенности растений, тогда как 2 мМ оказывалась летальной.

Оптимальной концентрацией для селекции на устойчивость к металлам можно считать 200 мкМ ионов меди. Данная концентрация вызывала двух кратное снижение содержания хлорофиллов в проростках и уменьшение длины корешка, достоверно уменьшала длину гипокотеля и более чем в два раза уменьшала всхожесть семян.

Реакция проростков табака на действие ионов меди в значительной степени отличалась от реакции проростков клевера. Испытанные концентрации ионов меди не оказывали существенного влияния на всхожесть семян, однако резко уменьшали длину корешка. Для селекции растений табака на устойчивость к ТМ целесообразно использовать концентрацию в 125 мкМ ионов меди.

## Литература

1. Бутенко Р. Г. Культура клеток растений и биотехнология. – Л.: Наука, - 1986. - 286 с.
2. Гладков Е. А., Долгих ЮИ., Гладкова О. В. Клеточная селекция газонных трав, толерантных к ионам меди. // Биотехнология - 2006. - № 5 – С. 53-58.с.
3. Егорова Н. А. Разработка методических основ клеточной селекции лаванды *in vitro* на устойчивость к NaCl. // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2011. – Вып. 5 – С. 173-179.
4. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. – Л.: Курс лекций, - 2009. – 94 с..
5. Крылова Е. Г., Васильева Н. В. Прорастание семян и развитие проростков представителей рода *Bidens* (*Asteraceae*) в растворах сульфата меди. // Вестник Томского государственного университета. – 2011. - № 352. – С. 207-210.
6. Куренина Л. В. Разработка системы регенерации *in vitro* для генетической трансформации клевера лугового (*Trifolium pratense* L.): дис. канд. биол. наук. – Москва, 2003. – 166 с.